

## 研究报告



## 高山被孢霉中二酰甘油酰基转移酶 2 同源基因的克隆、表达和活性分析

李俊 曹珺 唐鑫 张灏 陈卫 陈海琴\*

江南大学食品学院 江苏 无锡 214122

**摘要:**【背景】高山被孢霉(*Mortierella alpina*)是一种可积累大量花生四烯酸(Arachidonic Acid, AA)的产油丝状真菌,其所产脂肪酸主要被组装到甘油骨架上以三酰甘油(Triacylglycerol, TAG)形式存在。二酰甘油酰基转移酶(Diacylglycerol Acyltransferase, DGAT)是 TAG 生物合成途径的关键酶,对于高山被孢霉 TAG 的生产具有重要意义。【目的】通过探究高山被孢霉 DGAT2 在 TAG 生物合成方面的功能特点,以期为提高产油真菌的 TAG 产量及改善 TAG 的脂肪酸组成提供参考。【方法】利用序列比对在高山被孢霉 ATCC 32222 基因组中筛选出 2 个编码 DGAT2 的候选基因 *MaDGAT2A/2B*,在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中异源表达后进行功能分析,并在外源添加 AA 条件下通过检测 TAG 产量进一步分析 *MaDGAT2A/2B* 的活性,最后在高山被孢霉中同源过表达 *MaDGAT2A/2B*,通过检测重组菌总脂肪酸产量及组分以分析 *MaDGAT2A/2B* 的体内活性。【结果】*MaDGAT2A* 在 *S. cerevisiae* 中异源表达时,重组酵母菌 TAG 的产量达到细胞干重的 3.06%,为对照组的 4.91 倍;而 *MaDGAT2B* 未明显提高重组酵母菌 TAG 的产量。在外源添加 AA 时,*MaDGAT2A/2B* 均可显著促进重组酵母菌中 TAG 合成,表达 *MaDGAT2A* 的重组酵母菌 TAG 含量为对照组的 3.67 倍,表达 *MaDGAT2B* 的重组酵母菌 TAG 含量为对照组的 2.61 倍。*MaDGAT2A/2B* 在高山被孢霉中过表达对其总脂肪酸产量无显著影响,但可显著提高总脂肪酸中 AA 的含量,AA 占总脂肪酸比例最高达到 39.15%,相比对照组提高 16.14%。【结论】*MaDGAT2A/2B* 可以参与 TAG 的生物合成,表明 2 个候选基因编码的蛋白具有 DGAT 活性,并且可提高高山被孢霉脂肪酸中 AA 的含量,对于改善产油真菌的脂肪酸组成从而提高其应用价值具有重要意义。

**关键词:** 二酰甘油酰基转移酶 2, 高山被孢霉, 三酰甘油, 产油真菌, 花生四烯酸

### Cloning, expression and activity analysis of homologous genes of diacylglycerol acyltransferase 2 in *Mortierella alpina*

LI Jun CAO Jun TANG Xin ZHANG Hao CHEN Wei CHEN Haiqin\*

School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

**Abstract:** [Background] *Mortierella alpina* is an oleaginous fungus that can accumulate a large amount of arachidonic acid (AA). The fatty acids produced by *M. alpina* are mainly assembled on the glycerol

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (31722041)

\*Corresponding author: Tel: 86-510-85197239; E-mail: haiqinchen@jiangnan.edu.cn

Received: 31-03-2021; Accepted: 05-07-2021; Published online: 29-07-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31722041)

\*通信作者: Tel: 0510-85197239; E-mail: haiqinchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2021-03-31; 接受日期: 2021-07-05; 网络首发日期: 2021-07-29

skeleton and present in the form of triacylglycerol (TAG). Diacylglycerol acyltransferase (DGAT) is a key enzyme in the biosynthetic pathway of TAG and plays an important role in TAG production of *M. alpina*. **[Objective]** This study explored the functional characteristics of *M. alpina* DGAT2 in TAG biosynthesis, aiming to provide a reference for promoting the TAG production of oleaginous fungi and improving the fatty acid composition of TAG. **[Methods]** Two candidate genes *MaDGAT2A/2B* were screened from the *M. alpina* ATCC 32222 genome by sequence alignment. Functional characterization of *MaDGAT2A/2B* were performed by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Then the activity of *MaDGAT2A/2B* was further analyzed by detecting TAG yield under the condition of exogenous addition of AA. Finally, the *in vivo* activity of *MaDGAT2A/2B* was analyzed by detecting the total fatty acid yield and composition of the *M. alpina* recombinant strains overexpressing *MaDGAT2A/2B*. **[Results]** The transforming with *MaDGAT2A* gene could increase the production of TAG in *S. cerevisiae* to 3.06% of dry cell weight, which was 4.91-fold of the control group; while *MaDGAT2B* did not significantly increase the yield of TAG in *S. cerevisiae*. When AA was added exogenously, *MaDGAT2A/2B* could promote TAG synthesis in the yeast recombinant strains. The TAG content of recombinant yeast expressing *MaDGAT2A* was 3.67-fold of the control group. The TAG content of recombinant yeast expressing *MaDGAT2B* was 2.61-fold of the control group. Overexpression of *MaDGAT2A/2B* in *M. alpina* had no significant effect on the total fatty acid yield, but could significantly increase the content of AA in total fatty acids, up to 39.15%, an increase of 16.14% compared to the control group. **[Conclusion]** *MaDGAT2A/2B* could participate in the biosynthesis of TAG, indicating that the two proteins encoded by the two candidate genes have DGAT activity. And *MaDGAT2A/2B* could increase the content of AA in *M. alpina*, which is of great significance for improving the lipid composition of oleaginous fungi and increasing their application value.

**Keywords:** diacylglycerol acyltransferase 2, *Mortierella alpina*, triacylglycerol, oleaginous fungus, arachidonic acid

产油微生物可积累超过自身细胞干重(Dry Cell Weight, DCW) 20%的脂质<sup>[1]</sup>, 这类微生物脂质产量高、生产周期短、不受季节和气候影响、不占用农业耕地<sup>[2-3]</sup>, 并且所产脂质的脂肪酸组成丰富, 包括多种可以降低动脉粥样硬化、心血管疾病等风险的有益于人体健康的多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA)<sup>[4]</sup>, 目前已实现花生四烯酸(Arachidonic Acid, AA)、二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic Acid, EPA)和二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic Acid, DHA)的工业化生产并应用于食品工业<sup>[5-7]</sup>。

三酰甘油(Triacylglycerol, TAG)是动物、植物、微生物细胞中主要的储藏性脂类, 作为一种富含能量的脂质<sup>[8]</sup>, 被广泛用于营养品、化学工业和高能量密度燃料的生产。TAG 的主要生物合成途径为 Kennedy 途径<sup>[9]</sup>, 在多种酰基转移酶的作用下, 3 个脂酰基依次连接到甘油-3-磷酸的甘油骨架上

从而形成 TAG。TAG 中脂肪酸组成的差异会导致其具有不同的化学性质、生理功能<sup>[4]</sup>。在 TAG 的合成途径中, 二酰甘油酰基转移酶(Diacylglycerol Acyltransferase, DGAT)催化最后一步反应, 即催化脂酰辅酶 A 的酰基结合到二酰甘油(Diacylglycerol, DAG)上形成 TAG<sup>[9]</sup>。大量研究显示, DGAT 在 TAG 合成中发挥着重要作用<sup>[10-12]</sup>。例如, DGAT2 敲除鼠由于体内 TAG 含量过低只能存活数小时<sup>[13]</sup>。将来自卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)或圆红冬孢酵母(*Rhodospiridium toruloides*)的 DGAT2 在酿酒酵母 H1246 (TAG 合成缺陷型菌株)中进行表达, 重组酵母菌均可恢复 TAG 的合成能力<sup>[14-15]</sup>。

产油丝状真菌高山被孢霉 (*Mortierella alpina*), 可生产高达菌体干重 50%的脂质, 其中 AA 含量丰富, 在总脂肪酸中占比可达到 30%–40%, 而 *M. alpina* 所产脂肪酸主要被组装到甘油骨架上以 TAG 形式存在<sup>[16]</sup>。通过 *M. alpina*

生产的油脂被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)鉴定为一般认为安全(Generally Recognized as Safe, GRAS),所产的AA已用作婴幼儿配方奶粉的添加剂<sup>[5,17]</sup>。因此,探究*M. alpina*中DGAT的TAG合成活性具有重要意义。

目前关于*M. alpina*中DGAT的研究较少,Luo等<sup>[18]</sup>将MaDGAT2在酿酒酵母H1246中异源表达恢复了其TAG的合成,使得重组菌总脂肪酸含量提高35.6%。Jeennor等<sup>[19]</sup>同样通过在酿酒酵母H1246中异源表达鉴定了另一种MaDGAT2的功能,显示可使酿酒酵母重组菌总脂肪酸产量增加30.9%。综上所述可以看出,虽然已有文献分别研究了*M. alpina*中的2种DGAT2,但是相关研究仅限于在酿酒酵母中的异源表达,而且均只研究了单一的MaDGAT2,未将*M. alpina*中的2种DGAT2进行比较分析。另一方面,已有报道均未在*M. alpina*体内分析DGAT的功能,而由于TAG的脂肪酸组成与宿主内源脂肪酸及去饱和酶相关,仅从异源表达分析DGAT的功能特征存在一定的局限性<sup>[20]</sup>。

本研究通过序列比对筛选出*MaDGAT2A/2B*候选基因,通过生物信息学相关分析工具分析了候选基因编码蛋白MaDGAT2A/2B的序列特征,通过在酿酒酵母中异源表达*MaDGAT2A/2B*,分析酿酒酵母重组菌中TAG的含量及脂肪酸组成,探究MaDGAT2A/2B的TAG合成活性,最后在*M. alpina*中同源过表达*MaDGAT2A/2B*,分析高山被孢霉重组菌总脂肪酸产量及脂肪酸组成进一步表征二者的功能特点,为深入了解高山被孢霉DGAT2的功能特性、提高其TAG产量及改善TAG中的脂肪酸组成提供了一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

KOD-Plus-DNA聚合酶,TOYOBO公司;反转录试剂盒,TaKaRa公司;质粒提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;真菌基因组DNA提取试剂盒,BioFlux公司;限制性内切酶(*EcoR* I、*Kpn* I、

*Not* I)、Trizol、抗体(6×His-Tag Monoclonal Antibody), Thermo Scientific公司;棉籽糖、无氨基酸酵母氮源(Yeast Nitrogen Base, YNB)和各类氨基酸、氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kana)、利福平(Rif)、壮观霉素(Spe)、头孢噻肟钠(Cef)、吗啉乙磺酸(MES)、乙酰丁香酮(AS)、尿嘧啶(Uracil),生工生物工程(上海)股份有限公司;BCA蛋白测定试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;正十五烷酸(C15:0),Sigma公司;其他常规化学试剂,中国医药集团有限公司。实验所用引物由上海桑尼生物科技有限公司合成,测序工作由上海华大基因完成。

PCR仪,Bio-Rad公司;蛋白电泳仪、电泳转膜仪,上海天能科技有限公司;薄层层析硅胶板,山东乳山太阳干燥剂有限公司;GCMS-QP2010 Ultra气相色谱质谱联用仪,岛津公司。

### 1.2 质粒、菌株及培养条件

游离型穿梭表达载体pYES2/NT C,购于Invitrogen公司,在多克隆位点上游有*GAL1*半乳糖诱导型启动子,在大肠杆菌中的筛选标记为编码Amp抗性蛋白的基因,在酿酒酵母中的筛选标记为编码Uracil的基因;二元表达载体pBIG2-ura5s-ITs,用作根癌农杆菌介导转化高山被孢霉的转化载体,含有Kana抗性标记、Uracil回补单元(编码乳清酸磷酸核糖转移酶OPRTase的*ura5*基因),由本课题组前期构建<sup>[21]</sup>。

大肠杆菌DH5 $\alpha$ 菌株,37℃条件下于LB培养基培养<sup>[21]</sup>,用于保存质粒;根癌农杆菌CCFM 834,28℃、200 r/min条件下于YEP、MM培养基培养<sup>[21]</sup>,用于遗传转化;酿酒酵母营养缺陷型菌株INVSc1,购于Invitrogen公司,28℃、200 r/min条件下培养于YPD、SC-U筛选培养基、SC-U诱导培养基(Cat.no.V825-20,Invitrogen);高山被孢霉ATCC 32222购于美国菌种保藏中心,用于获得*MaDGAT2A/2B*基因;高山被孢霉尿嘧啶营养缺陷型菌株CCFM 501,用作根癌农杆菌介导转化的实验组受体菌株,尿嘧啶回补型高山被孢霉CCFM 505(原养型菌株)

用作实验对照菌株,二者均由本课题组自行构建并保藏于江南大学食品生物技术研究中心<sup>[22]</sup>,高山被孢霉于 Broth 种子培养基中 28 °C、200 r/min 扩大生长<sup>[21]</sup>。

### 1.3 高山被孢霉 DGAT2 的序列比对及筛选

以 *M. alpina* ATCC 32222 基因组<sup>[16-17]</sup>数据建立 BLAST 本地库,根据 NCBI 中已鉴定功能的 ScDGAT2、AtDGAT2、MmDGAT2、VfDGAT2、MrDGAT2A 对应编码基因序列进行比对(表 1)。使用 DNAMAN 软件分析候选序列与上述筛选模板序列的同源性,及候选序列的保守性,通过在线软件 ExPASy-ProtParam Tool 预测蛋白大小和等电点。

### 1.4 高山被孢霉 DGAT2 在酿酒酵母中的异源表达

#### 1.4.1 MaDGAT2A/MaDGAT2B 的克隆及表达载体构建

收集 *M. alpina* 菌体,利用液氮充分研磨至粉末状,通过 Trizol 法提取总 RNA,具体步骤详见之前的报道<sup>[21]</sup>。利用反转录试剂盒获得 cDNA。以 cDNA 为模板,分别使用 MaDGAT2A F/MaDGAT2A R、MaDGAT2B F/MaDGAT2B R 引物(表 2),通过 PCR 反应扩增目的基因 *MaDGAT2A*、*MaDGAT2B* (退火温度为 60 °C,延伸时间为 1 min)。扩增产物经对应的限制性内切酶(表 2)酶切 1 h 后,利用 T4 连接酶将扩增产物与 pYES2/NT C 表达载体连接,

表 1 不同物种来源的 DGAT2 基因信息

Table 1 DGAT2 gene information from different species

基因	来源宿主	cDNA 编号
Gene	Source host	cDNA No.
<i>ScDGAT2</i>	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NM_001183664.1
<i>AtDGAT2</i>	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_115011.3
<i>MmDGAT2</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>	NM_026384.3
<i>VfDGAT2</i>	油桐 <i>Vernicia fordii</i>	DQ356681.1
<i>MrDGAT2A</i>	拉曼被孢霉 <i>Mortierella ramanniana</i>	AF391089.1

连接于  $\beta$ -半乳糖苷酶(*GAL1*)启动子下游的对应多克隆位点(条件: 16 °C, 12–16 h),通过化学转化法将连接产物导入 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  中。通过菌液 PCR 验证转化子,使用 T7/T7 Terminator 引物(表 2)进行 PCR 扩增,PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,将验证正确的大肠杆菌转化子进行测序分析,测序无误的大肠杆菌阳性转化子保存于-80 °C。

#### 1.4.2 酿酒酵母重组菌构建

参考 pYES2 质粒手册,利用 PEG/LiAc 法将 1.4.1 中测序正确的重组质粒和空载体 pYES2/NT C (用作阴性对照)分别转化到酿酒酵母菌株 INVSc1 中。通过 SC-U 平板筛选,提取酿酒酵母重组菌基因组、使用 T7/T7 Terminator 引物进行 PCR 验证。

表 2 引物信息

Table 2 Primer information

引物	引物序列	限制性内切酶
Primers	Primers sequence (5'→3')	Restriction endonuclease
MaDGAT2A F	CATTAGGTACCAATGGCCATCTTTGCCCCAT	<i>Kpn</i> I
MaDGAT2A R	ATAAGAATCGGCCCGCCTATTCAATGATCTGGAGCTCCTGCG	<i>Not</i> I
MaDGAT2B F	CCGGAATTCATGCCGCTATTTGCGCCTC	<i>Eco</i> R I
MaDGAT2B R	ATAAGAATCGGCCCGCCTATTCGATGATGCATAGTTCCTG	<i>Not</i> I
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	/
T7 terminator	TCGGTTAGAGCGGATGTG	/
Hispro F2	GTGTTCACTCGCATCCCGC	/
Trp CR2	AGGCACTCTTTGCTGCTTGG	/

注: 划线处为酶切位点; /: 无限制性内切酶酶切位点

Note: The underline is the restriction site; /: No restriction endonuclease cleavage site

### 1.4.3 Western Blot

酿酒酵母重组菌诱导培养 48 h 后, 取约 2 mL 培养物, 5 000×g 离心 5 min 收集菌体。以适量裂解液回溶菌体使得  $OD_{600}$  约为 50–100, 并加入等体积玻璃珠(0.5 mm)进行破碎得到酿酒酵母重组菌的全细胞蛋白粗提液, 通过 Western Blot 分析目的蛋白在酿酒酵母中的表达。首先经 SDS-PAGE (10%分离胶)分离样品, 然后转移至 PVDF 膜上(200 mA、1 h)。使用 His 抗体(稀释度为 1:2 000)作为第一抗体, 孵育 12 h 后与鼠二抗(稀释度为 1:5 000)结合, 然后与化学发光溶液反应并在成像仪上显影拍照。

### 1.4.4 外源添加脂肪酸

向 SC-U 诱导培养基中添加 AA, 终浓度为 0.5 mmol/L。AA 用甲醇(HPLC 级)溶解, 通过有机滤器(0.22  $\mu$ m)滤菌后添加。培养条件同 1.2 中所述。

## 1.5 高山被孢霉 DGAT2 的同源过表达

### 1.5.1 表达载体构建

目的基因的获得与克隆方法同 1.4.1。将扩增得到的 *MaDGAT2A/MaDGAT2B* 与表达载体 pBIG2-ura5s-ITs 用对应的限制性内切酶(表 2)进行双酶切 3–4 h, 然后用 T4 连接酶连接(条件同 1.4.1)。将上述重组质粒导入大肠杆菌感受态细胞, 涂布于添加 Kana 的 LB 固体平板, 待长出转化子后进行菌落 PCR 验证, 使用 Hispro F2/Trp CR2 引物(表 2)进行 PCR 验证, 验证方法同 1.4.1 所述。

### 1.5.2 根癌农杆菌介导法转化高山被孢霉

采用电击转化法将 1.5.1 中的重组质粒转入根癌农杆菌中, 至转化子长出后用 Hispro F2/Trp CR2 引物进行菌落 PCR 验证及测序。将阳性转化子培养于 YEP 培养基中, 然后以 1%接种量接种于 MM 液体培养基, 同时添加 MES, 再以 1%接种量接到 IM 培养基。在上述转接 IM 培养基前约 12 h 收集高山被孢霉 CCFM501 孢子<sup>[23]</sup>。将 MM 培养基中生长状态良好的根癌农杆菌菌液与适宜浓度的高山被孢霉孢子液以不同比例混合后涂布于贴有玻璃膜的 IM 固体平板。待膜上有适当密度的霉菌和

细菌生长出后将玻璃膜转移至 SC-CS (含 Cef、Spe) 固体平板进行筛选。有疑似阳性转化子长出后, 用镊子挑取菌落边缘菌丝转移至新的 SC-CS 平板上, 反复传代 3 次, 将能连续生长的菌株判定为遗传稳定的高山被孢霉疑似阳性重组菌。将其接种于 Broth 种子液体培养基中培养后提取基因组, 使用 Hispro F2/Trp CR2 引物(表 2)进行 PCR 验证, 验证正确的即为高山被孢霉阳性转化子。根癌农杆菌介导法转化高山被孢霉的具体细节参考文献[22]。

### 1.6 脂质提取及脂肪酸组成分析

对于酿酒酵母重组菌, 称取 20 mg 冻干菌体, 利用甲醇-氯仿法提取总脂质<sup>[21]</sup>。通过薄层色谱法(Thin-Layer Chromatography, TLC)分离总脂质<sup>[24]</sup>, 所用展开剂为正己烷:乙醚:乙酸=80:20:1 (体积比)。使用碘蒸气熏染显色。刮下 TAG 斑点置于提脂玻璃瓶中, 加入 100  $\mu$ g C15:0 标准品, 使用 3 mol/L 盐酸-甲醇进行甲酯化。通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析 TAG 中的脂肪酸组分和含量<sup>[22]</sup>。

对于高山被孢霉重组菌, 收集发酵培养基中培养 7 d 的高山被孢霉菌体, 于真空冷冻干燥机中冻干, 然后称量菌体干重表征生物量。称取 50 mg 冻干菌体, 提取总脂肪酸并甲酯化, 具体操作参考文献[21]。GC-MS 检测方法同上。

### 1.7 统计分析

采用 GraphPad Prism 5.0 作图, 数据以 Mean $\pm$ SD 表示; 通过 SPSS 20.0 数据处理系统中单因素方差分析(One-Way ANOVA)的 Duncan 检验分析显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 高山被孢霉 DGAT2 的比对及筛选

根据 1.3 所述方法, 从本实验前期已完成测序的 *M. alpina* ATCC 32222 基因组中筛选出 2 个 DGAT2 编码序列, 分别命名为 *MaDGAT2A*、*MaDGAT2B*。

*MaDGAT2A*、*MaDGAT2B* 与筛选模板的氨基酸序列比对的结果见图 1, 结果显示二者与不

MaDGAT2A	..... MAI FAPI FLP	10
MaDGAT2B	..... MPLFAPLRMP	10
AtDGAT2 (NP_566952.1)	..... MGGSREFRAEEHS	13
MmDGAT2 (NP_080660.1)	<b>MKTLI AAYS GVLRGERRAE AARS ENKNKGS ALS REGS GRWGTGSS I LS ALQDI FS VTWLN</b>	60
MrDGAT2A (AAK84179.1)	..... <b>MAS KDQHLQQKVKHTLEAI PS PRYAPLRVP</b>	30
ScDGAT2 (NP_014888.1)	..... <b>MS GTFNDI RRRKKEEGS P TAGI TERHENKSLSSI DKREQTLKQLES CCPLATP</b>	54
VfDGAT2 (ABC94473.1)	..... <b>MGMVEVKNEEVEVTI FKS GEI Y</b>	21
Consensus		
MaDGAT2A	... <b>I KRRLQTA AVLVM I SALAVS. . TMVFFYLCTI. KYLWPLI I I YLLWI LMFDRAP EQG</b>	64
MaDGAT2B	... <b>I KRRMQTGAVLLMI SGI I YM. . LGI FVFLCTF. KVLRLPI I MYLLWAFI LDRGPERG</b>	64
AtDGAT2 (NP_566952.1)	... <b>NQFHS I I A MAI MLGAI HFN. . . VALVLC SLI FLPPSLSLMVLGLLS LFI FI PI DH</b>	65
MmDGAT2 (NP_080660.1)	<b>RS KVEKQLQVI S VLQWVLS FLYLVGVACS VI LMYTFCTDCWLI AVLYFTWLAFDWNTPKKG</b>	120
MrDGAT2A (AAK84179.1)	... <b>LRRRLQTLA VLL MCS MMSI C. . MFI FFFLCSI PVLLWFP I I LYLTWI LVWDKAPENG</b>	85
ScDGAT2 (NP_014888.1)	... <b>FERRLQTLA VAWH TSS FVLF. . . SI FTLFAI STPALWVLA I PYMI YFFFD. RSPATG</b>	107
VfDGAT2 (ABC94473.1)	<b>P. . TNI FQSVLALAI VLGS FHF. . . I LFLVSSSI FLPPS KFLVLI GLLLFFMVI PI ND</b>	74
Consensus		P
MaDGAT2A	<b>GRRFQW. . WRRWVGWP YFAQYFP MTLI KEGDLDP. . . SKN. . . . .</b>	99
MaDGAT2B	<b>ARPVQW. . YRNWI GWKHF AQYFP MTLI VKEGEIDP. . . SKN. . . . .</b>	99
AtDGAT2 (NP_566952.1)	<b>RS KYGR. . KLARYI CKHACNYFP VSLYVEDYEAFQ. . . PNR. . . . .</b>	101
MmDGAT2 (NP_080660.1)	<b>GRRS QW. . VRNVAWRYFRDYFPI QLVKTHNLLT. . . TRN. . . . .</b>	155
MrDGAT2A (AAK84179.1)	<b>GRPI RW. . LRNAAWKLFAGYFPAHVI KEADLDP. . . SKN. . . . .</b>	120
ScDGAT2 (NP_014888.1)	<b>EVVNRYS LRF RSLPI WKWYCDYFPI SLI KTVNLKPTFTLS KNKRVNEKNYKI RLWPTKYS</b>	167
VfDGAT2 (ABC94473.1)	<b>RS KLQG. . CLFSYI SRHVCS YFPI TLHVEDI NAFR. . . SDR. . . . .</b>	110
Consensus		YFP
MaDGAT2A	..... <b>YI FGYHPHGI I SLGAFCTFGTEGLNFS KRFP GI QTRLLTL</b>	139
MaDGAT2B	..... <b>YI FGYHPHGI I SLGAFCTFGTEGLHFS KRFP GI KPQLLTL</b>	139
AtDGAT2 (NP_566952.1)	..... <b>AVVFGYEPHSLVPI GVVALCD. . . . . LTGFMP I PNI KVLAS</b>	137
MmDGAT2 (NP_080660.1)	..... <b>YI FGYHPHGI MGLGAF CNFS TEATEVSKKFP GI RPYLATL</b>	195
MrDGAT2A (AAK84179.1)	..... <b>YI FGYHPHGI I SMGS FCTFS TNATGFDDLFP GI RPS LLLTL</b>	160
ScDGAT2 (NP_014888.1)	<b>I NLKSNSTI DYRNQECTGPT YLFGYHPHGI GALGAFGAFATEGCNYS KI FPGI PI SLMTL</b>	227
VfDGAT2 (ABC94473.1)	..... <b>AVVFGYEPHSLVFP I GVM I LS. . . . . LGLI PLPNI KFLAS</b>	144
Consensus		Y FGY PH G P
MaDGAT2A	<b>QSNFQI P FYRDYI MAHGCAS VSKAS CEYI LR. S GPGNSI AI VVGGAQES LAAKPGTLDLT</b>	198
MaDGAT2B	<b>HANFQVPL YREMVMMAHGCAS VSRAS CEHI LR. S SEGCS VVI VVGGAQES LSTRPGTLNLT</b>	198
AtDGAT2 (NP_566952.1)	<b>S AI FYT PFLRHI WTWLG LTAAS RKNFTS LLD. . . SGYS CVLVP GGVQETTFHMQDAENVF</b>	194
MmDGAT2 (NP_080660.1)	<b>AGNFRMP VLREYLS CGI CPVNRDTI DYLLS KNGS GNAI I I VVGGAAES LSSMPGKNVAT</b>	255
MrDGAT2A (AAK84179.1)	<b>TSNFNI PLYRDYLMACGLCS VSKTS CQNI LTKGGPGRSI AI VVGGAS LSNARPGVMDLV</b>	220
ScDGAT2 (NP_014888.1)	<b>VTQFHI PLYRDYLLALGI SSVSRKNALR TLS. . . KNQSI CI VVGGARESLSSSTNGTQLI</b>	284
VfDGAT2 (ABC94473.1)	<b>SAVFYTPFLRHI WSWG LTPATRKNFVSLLS. . . SGYS CI LVP GGVQETTFYMKQDS EI AF</b>	201
Consensus		F P R G L V GG E
MaDGAT2A	<b>LKKRLGFI KLALVNG. AS LVP TLA FGEN DLY ELYS AKHS SKTYQI QQLMKKFLGF T M P M F</b>	257
MaDGAT2B	<b>LKKRLGFC KLALVHG. AS LVP TLA FGEN ELYEYVYTA KP KSLMYKI QQFTKRTMGFT M P V F</b>	257
AtDGAT2 (NP_566952.1)	<b>LS RRRGFVRI AMEQG. S PLVP YFCFGQARVYKWKPD CD. . . . . LYLKLSRAI RFTPI CF</b>	248
MmDGAT2 (NP_080660.1)	<b>LKNRKG FV KLALRHG. ADLVP TYS FGENEVYKQVI FEEGS WGRWVQKKFQKYI GFAPCI F</b>	314
MrDGAT2A (AAK84179.1)	<b>LKRRFGFI KI AVQTG. AS LVP TI SFGENELYEQI ES NENS KLHRVQKKI QHALGFT M P L F</b>	279
ScDGAT2 (NP_014888.1)	<b>LNKRRGFI KLAI QTGNI NLVPVFAFG EYDCYNVLS TKKDS VLGKMQLWFKENFGFTI PI F</b>	344
VfDGAT2 (ABC94473.1)	<b>LKARRGFI RI AMQTG. TP LVP VFCFGMHTF KWKPDGE. . . . . LFMKI ARAI KFTPTI F</b>	255
Consensus		L R GF A G LVP FG f f
MaDGAT2A	<b>NGRGVFN. YEFGLL PRRKPVFI VI GKPI HVEKVEGA. PTTEQLQDLQKKYI DELLQI WDR</b>	315
MaDGAT2B	<b>NGRGI FN. YEFGLL PRRKPVSI VVGKPI HVDKVEN. . PTVEQMQLQSI YI DEVLSI WER</b>	314
AtDGAT2 (NP_566952.1)	<b>WG. . VFG. . . S PLP CRQP MHVVV GKPI EVTKTLK. . PTDEEI AKFHGQYVEALRDLFER</b>	300
MmDGAT2 (NP_080660.1)	<b>HGRGLFSS DTWGLVPYSKPI TTVVGEPI TVPKLEH. . PTQKDI DLYHAMYMEALVKLFDN</b>	372
MrDGAT2A (AAK84179.1)	<b>HGRGVFN. YDFGLL PRRHPI YTI V GKPI PVPSI KYGOTKDEI I RELHDS YMHAVQDLYDR</b>	338
ScDGAT2 (NP_014888.1)	<b>YARGLVN. YDFGLL PFRAP I NVVVGRPI YVEKKI TN. PPDDVVNHFDLYI AELKRLYYE</b>	402
VfDGAT2 (ABC94473.1)	<b>WG. . VL G. . . TP L P F K N P M H V V V G R P I E M K Q N P Q. . P T A E E V A E V Q R E F I A S L K N L F E R</b>	307
Consensus		P P G P I V
MaDGAT2A	<b>YKDRYAVGRTQELQI I</b>	331
MaDGAT2B	<b>YKDKYAAGRTQELCI I</b>	330
AtDGAT2 (NP_566952.1)	<b>HKS RVGY. DLELKI L.</b>	314
MmDGAT2 (NP_080660.1)	<b>HKTKFGLPETEVLEV N</b>	388
MrDGAT2A (AAK84179.1)	<b>YKDI YAKDRVKELEF V</b>	354
ScDGAT2 (NP_014888.1)	<b>NREKYGV PDAELKI VG</b>	418
VfDGAT2 (ABC94473.1)	<b>HKARVGY S DLKLEI F.</b>	322
Consensus		Y K D R Y A V G R T Q E L Q I I

图 1 MaDGAT2A/2B 的氨基酸序列比对和保守位点分析

Figure 1 Amino acid sequence alignment and conservative site analysis of MaDGAT2A/2B

注: 黑色和粉红色亮标部分为相似度 $\geq 75\%$ 的氨基酸, 划红线处为保守基序

Note: The black and pink highlighted parts are amino acids with a similarity greater than 75%, and the red line are conservative motifs

同来源 DGAT2 的序列相似性分别为 41.74%和 41.42%,对应 cDNA 全长分别为 999 bp 和 996 bp,分别编码 332、331 个氨基酸,标有红线处为蛋白的功能保守区域(Motif)<sup>[25-26]</sup>。据报道, DGAT2 亚家族有 6 个保守 Motifs: Motif1 (PH)、Motif2 (PR)、Motif3 (GGE)、Motif4 (RGFA)、Motif5 (VPFG)和 Motif6 (G)<sup>[25]</sup>,其中 Motif1 的 HPHG 被认为是蛋白质的活性位点和功能区<sup>[27]</sup>。从图 1 可以看出 MaDGAT2A、MaDGAT2B 均具有 DGAT2 家族的保守区域,所以,可以推测二者均具有 DGAT2 的相关功能。

## 2.2 酿酒酵母重组菌的构建及异源蛋白表达分析

按 1.4.1 所述方法构建得到重组质粒,分别命名为 pYES2-MaDGAT2A/2B,导入 *E. coli* DH5 $\alpha$  中,对验证正确的大肠杆菌转化子进行测序分析,将测序无误的大肠杆菌阳性转化子命名为 *E. coli*-pYES2-MaDGAT2A/2B。从上述大肠杆菌阳性转化子中提取重组质粒及空质粒分别导入酿酒酵母

INVSc1 菌株中,将验证正确的酿酒酵母重组菌分别命名为 *S. cerevisiae*-pYES2-MaDGAT2A/2B。

使用在线软件 ExPASy-ProtParam Tool 预测带有 6 $\times$ His 标签的 MaDGAT2A/2B 的分子量均约为 42 kD。Western Blot 分析结果如图 2A 所示,可知 *S. cerevisiae*-pYES2-MaDGAT2A/2B 中含有分子量大小为 34–43 kD 区间的蛋白,与预测结果相符,表明 MaDGAT2A/2B 在酿酒酵母中成功表达。图 2A 中 *S. cerevisiae*-pYES2-MaDGAT2A/2B 的蛋白上样量均为 100  $\mu$ g,通过 Image J 软件的灰度分析估算目的蛋白的表达水平,结果如图 2B 所示(以 MaDGAT2A 的灰度值为 1),可知 MaDGAT2B 在酿酒酵母中的相对蛋白表达水平为 MaDGAT2A 的 1.17 倍。

## 2.3 酿酒酵母重组菌的 TAG 产量及脂肪酸组成分析

利用 TLC 法分析从酿酒酵母重组菌的总脂质中分离出 TAG,结果如图 3A 所示。定量分析结果见图 3B,*S. cerevisiae*-pYES2-MaDGAT2A 所产 TAG

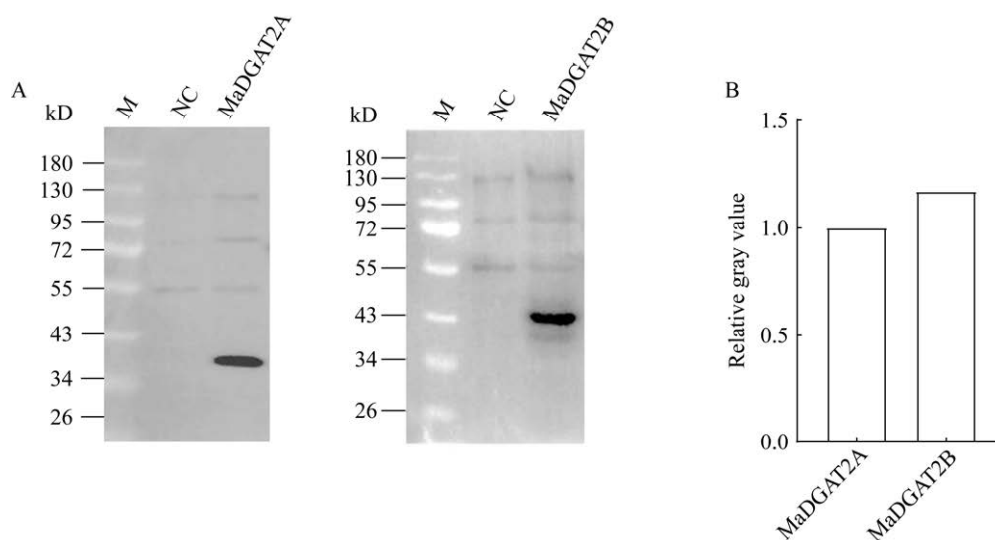


图 2 MaDGAT2A/2B 在酿酒酵母中的蛋白表达分析

Figure 2 Protein expression analysis of MaDGAT2A/2B in *S. cerevisiae*

注: A: Western Blot 分析 MaDGAT2A/2B 在酿酒酵母中的蛋白表达水平; B: MaDGAT2A/2B 的蛋白表达水平灰度值估算。M: 预染蛋白 marker; NC: 含有空载体的酿酒酵母重组菌 *S. cerevisiae*-pYES2

Note: A: Western Blot analysis of the protein expression level of MaDGAT2A/2B in *S. cerevisiae*; B: Gray value estimation of the protein expression level of MaDGAT2A/2B. M: Prestained protein marker; NC: *S. cerevisiae*-pYES2, recombinant *S. cerevisiae* containing an empty vector

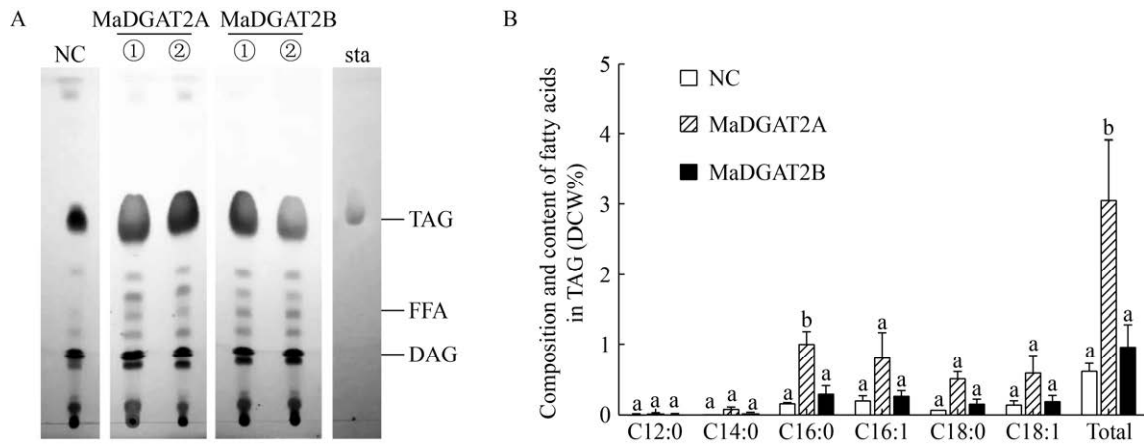


图 3 酿酒酵母重组菌 *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2A/2B* 中三酰甘油(TAG)的脂肪酸组成及含量分析

Figure 3 Fatty acid composition and content of triacylglycerol (TAG) in the *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2A/2B*

注: A: 酿酒酵母重组菌 *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2A/2B* 的总脂质薄层色谱分离图; B: 酿酒酵母重组菌 *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2A/2B* 中三酰甘油(TAG)的脂肪酸组成及含量分析。sta: 三棕榈酸甘油酯; NC: 含有空载体的酿酒酵母重组菌 *S. cerevisiae*-pYES2。不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$

Note: A: TLC separation of total lipids of *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2A/2B*; B: Fatty acid composition and content analysis of triacylglycerol (TAG) in *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2A/2B*. sta: Glycerol tripalmitate; NC: *S. cerevisiae*-pYES2, recombinant *S. cerevisiae* containing an empty vector. Different lowercase letters indicate significant differences,  $P < 0.05$

中总脂肪酸含量达到 3.06% (DCW%), 为对照组的 4.91 倍( $P < 0.05$ ), 表明 *MaDGAT2A* 具有二酰甘油酰基转移酶的功能。然而 *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2B* 的 TAG 产量相对对照组无显著提高, 可能有以下原因: *MaDGAT2B* 在酿酒酵母中的表达量过低; *MaDGAT2B* 不具备二酰甘油酰基转移酶的活性; 酿酒酵母中缺少 *MaDGAT2B* 的适宜底物。Xin 等<sup>[4]</sup>发现部分 NoDGAT2s 由于酿酒酵母中没有合适的脂肪酸底物而无法恢复酿酒酵母重组菌中的 TAG 合成。从图 3B 所示的 *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2A/2B* 中 TAG 的脂肪酸组成可看出, 除 *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2A* 中 C16:0 含量相对对照组显著增加外, 其他均与对照组无显著差异, 表明 *MaDGAT2A* 可能对 C16:0 脂肪酸有一定偏好性。

#### 2.4 外源添加 AA 条件下酿酒酵母重组菌的 TAG 含量分析

由 2.4 可知高山被孢霉来源的 *MaDGAT2A* 在酿酒酵母中异源表达对 TAG 合成有显著促进作用, 而 *MaDGAT2B* 则没有。为进一步探究

*MaDGAT2A/2B* 的功能是否与酿酒酵母体内含有适宜底物相关, 选择高山被孢霉脂肪酸中含量最高但酿酒酵母无法合成的 AA, 作为外源 PUFA 加入培养基。从图 4 中可知, 外源添加 AA 条件下, *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2A/2B* 中 TAG 积累量相对对照组均有显著增加, 其中 *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2A* 中 TAG 含量为 1.98% (DCW%), 是对照组的 3.67 倍, 而 *S. cerevisiae*-pYES2-*MaDGAT2B* 中 TAG 含量达到 1.41% (DCW%), 为对照组的 2.61 倍, 这说明 *MaDGAT2B* 在 AA 底物存在时具有 DGAT 活性。

#### 2.5 高山被孢霉 DGAT2 的同源过表达分析

##### 2.5.1 高山被孢霉重组菌的构建和验证

根据 1.5.1 中所述方法对二元表达载体进行验证, 结果如图 5A 所示。Hispro F2/Trp CR2 引物可与二元表达载体上 2 组相同的启动子(his550)、终止子(TrpCter)结合, 因而会扩增出目的基因外的尿嘧啶营养回补序列 *ura5* (861 bp)。*MaDGAT2A/2B* 在通用引物下的理论扩增长度分别为 1 231 bp 和 1 228 bp, 由结果可知表达载体构建成功, 将大肠杆菌阳性转



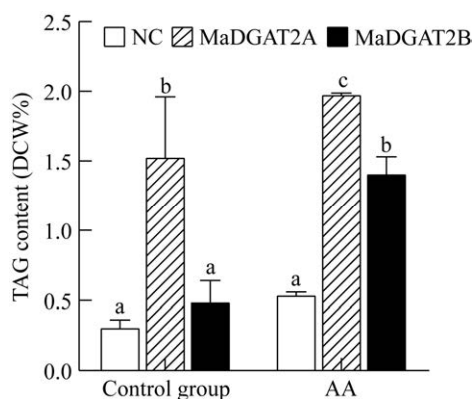


图4 外源添加AA条件下酿酒酵母重组菌 *S. cerevisiae*-pYES2-MaDGAT2A/2B 中TAG含量

Figure 4 TAG content in the *S. cerevisiae*-pYES2-MaDGAT2A/2B under the condition of exogenous addition of AA

注: AA: 在诱导培养基中添加终浓度为0.5 mmol/L的AA; Control group: 仅添加同等体积的脂肪酸溶剂(甲醇); NC: 含有空载体的酿酒酵母重组菌 *S. cerevisiae*-pYES2。不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$

Note: AA: AA was added to the induction medium at a final concentration of 0.5 mmol/L; Control group: Only added the same volume of fatty acid solvent (methanol); NC: *S. cerevisiae*-pYES2, recombinant *S. cerevisiae* containing an empty vector. Different lowercase letters indicate significant differences,  $P < 0.05$

化子分别命名为 *E. coli*-pBIG2-MaDGAT2A/2B。

从上述大肠杆菌阳性转化子中提取重组质粒转入根癌农杆菌, 根据 1.5.2 中所述方法对根癌农杆菌转化子进行验证, 验证结果如图 5B 所示, 转化子条带正确, 将经测序分析正确的根癌农杆菌阳性转化子命名为 *A. tumefaciens*-pBIG2-MaDGAT2A/2B。利用根癌农杆菌阳性转化子介导转化高山被孢霉, 根据 1.5.2 中所述方法对高山被孢霉重组菌进行验证, 如图 5C 所示, 可知获得了具有目的条带和 *ura5* 条带的阳性转化子, 表明高山被孢霉重组菌 *M. alpina*-pBIG2-MaDGAT2A、*M. alpina*-pBIG2-MaDGAT2B 构建成功。

### 2.5.2 高山被孢霉重组菌的产脂水平分析

由图 6A 可知, 与对照组相比, 分别过表达 MaDGAT2A/2B 的高山被孢霉重组菌总脂肪酸含量均没有显著变化。这可能是由于高山被孢霉重组菌的脂质合成受限于底物的量, 作为合成 TAG 的

底物之一的二酰甘油(DAG)除了合成 TAG 外还会生成各种磷脂, 因而与 TAG 合成有一定的底物竞争关系。

值得注意的是, 如图 6B 所示, 过表达 MaDGAT2A/2B 可使得高山被孢霉所产总脂肪酸中 AA 的含量增加, 其中 *M. alpina*-pBIG2-MaDGAT2A 中 AA 含量增加更为显著, 最高达到 39.15% (DCW%), 相比对照组提高 16.14%。在高山被孢霉中过表达 MaDGAT2A/2B 对其总脂肪酸产量无显著影响, 但可显著提高总脂肪酸中 AA 的含量, 这可为改善高山被孢霉脂质的脂肪酸组成从而提高其应用价值提供一定的参考。

## 3 讨论与结论

PUFA 具有多种重要的生物学功能, 对生物体的生长发育起到重要作用。动植物来源的 PUFA 无法满足人们不断增长的需求, 因此, 能够生产 PUFA 的产油微生物受到越来越多的关注。微生物油脂主要来源于细菌、真菌和藻类, 其中, 产油真菌由于具有易于培养、生长速率快、发酵条件易控等优点已成为生产 PUFA 的主要微生物<sup>[28]</sup>。目前对于产油真菌的研究主要集中于酵母菌和霉菌, 相比之下, 霉菌中脂肪酸类型比酵母菌丰富, 因此受到更广泛的关注。DGAT 催化 TAG 生物合成途径的最后一步反应, 近年来许多研究聚焦于 DGAT, 旨在鉴定产油微生物中 DGAT 的功能, 来达到提高产油微生物中 TAG 的产量并改善脂肪酸组成的目标。本研究中的 *M. alpina* 是一种以 TAG 形式积累多种  $\omega$ -6 PUFA 的产油真菌, 具有很好的应用前景, 因此探究 *M. alpina* 中 DGAT 的功能特点具有重要意义。

目前针对 *M. alpina* 中 DGAT 的报道较少, Luo 等<sup>[18]</sup>报道了一种 *M. alpina* 来源的 DGAT2, 与本研究 MaDGAT2B 氨基酸序列相似性为 96%, 而与 MaDGAT2A 相似性为 73%, 该报道发现 *M. alpina* 来源的 DGAT2 使得异源表达宿主总脂肪酸含量提升 34%, 而本研究中 MaDGAT2A 使得醇

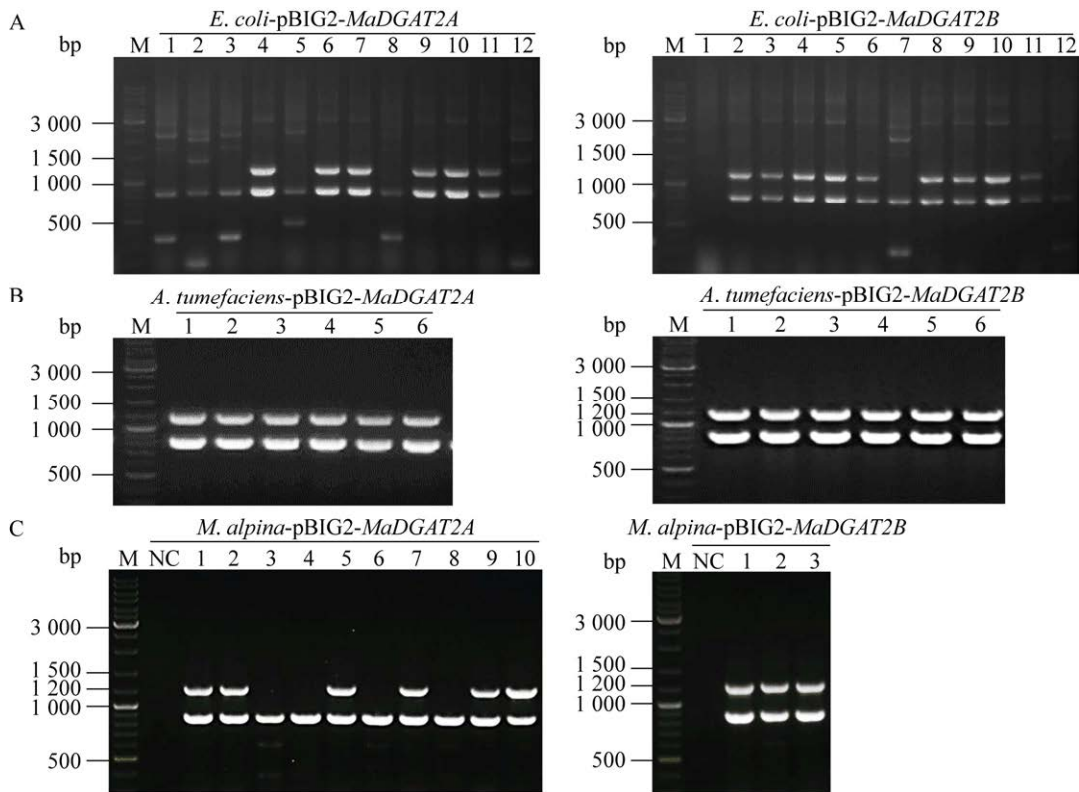


图 5 高山被孢霉重组菌 *Mortierella alpina*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B* 的筛选验证

**Figure 5 Verification of the *Mortierella alpina*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B***

注: A: 大肠杆菌重组菌 *E. coli*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B* (用于保存质粒)的验证; B: 根癌农杆菌重组菌 *A. tumefaciens*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B* (用于介导转化高山被孢霉)的验证; C: 高山被孢霉重组菌 *M. alpina*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B* 的验证。M: GeneRuler DNA ladder mix marker; NC: 不含 DNA 模板

Note: A: Verification of the recombinant strains *E. coli*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B* (used to store plasmids); B: Verification of the recombinant strains *A. tumefaciens*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B* (used to mediate transformation of *M. alpina*); C: Verification of the recombinant strains *M. alpina*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B*. M: GeneRuler DNA ladder mix marker; NC: No DNA template

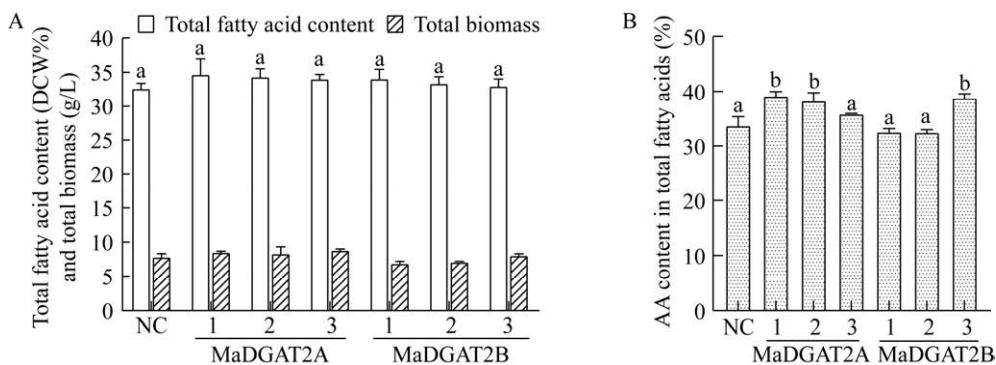


图 6 *Mortierella alpina*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B* 的脂肪酸含量及总生物量

**Figure 6 Fatty acid content and total biomass of *Mortierella alpina*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B***

注: A: *M. alpina*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B* 的总脂肪酸含量及总生物量; B: *M. alpina*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B* 的总脂肪酸中 AA 含量; NC: *M. alpina* 尿嘧啶回补型; 1/2/3: 转化子编号。不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$

Note: A: Total fatty acid content and total biomass of *M. alpina*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B*; B: AA content of *M. alpina*-pBIG2-*MaDGAT2A/2B*; NC: Uracil-replenishing *M. alpina*; 1/2/3: Transformant No.. Different lowercase letters indicate significant differences,  $P < 0.05$

酒酵母 TAG 产量达到对照组的 4.91 倍。Jeenor 等<sup>[19]</sup>研究了另一种 *M. alpina* 来源的 DGAT2, 经序列比对发现与本研究中的 MaDGAT2A 相似性为 100%, 与 MaDGAT2B 相似性为 73%, 该研究中异源表达 *MaDGAT2* 的宿主总脂肪酸含量提升 30.9%。以上研究均未对 MaDGAT2 进行高山被孢霉体内的活性分析。本研究通过生物信息学分析工具筛选获得了 *M. alpina* 中 DGAT2 的同源基因 *MaDGAT2A/2B*, 并分析了其氨基酸序列保守基序, 通过在酿酒酵母中异源表达对 MaDGAT2A/2B 进行了功能鉴定, MaDGAT2A 表现出具有促进 TAG 合成的功能, 而 MaDGAT2B 在外源添加 AA 底物后表现出 DGAT 活性。在 *M. alpina* 中过表达 *MaDGAT2A/2B*, 对 *M. alpina* 中总脂肪酸产量无显著影响, 但可提高其中 AA 的含量。本研究为提高产油真菌的 TAG 产量及 TAG 中多不饱和脂肪酸含量的代谢工程提供了一定参考。

## REFERENCES

- [1] Kosa M, Ragauskas AJ. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research[J]. Trends in Biotechnology, 2011, 29(2): 53-61
- [2] Jones AD, Boundy-Mills KL, Barla GF, Kumar S, Ubanwa B, Balan V. Microbial lipid alternatives to plant lipids[J]. Methods in Molecular Biology: Clifton, N J, 2019, 1995: 1-32
- [3] Lu HQ, Chen HQ, Tang X, Zhao JX, Zhang H, Chen W. Application of omics technology in oleaginous microorganisms[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(3): 846-859 (in Chinese)  
卢恒谦, 陈海琴, 唐鑫, 赵建新, 张灏, 陈卫. 组学技术在产油微生物中的应用[J]. 生物工程学报, 2021, 37(3): 846-859
- [4] Xin Y, Shen C, She YT, Chen H, Wang C, Wei L, Yoon K, Han DX, Hu Q, Xu J. Biosynthesis of triacylglycerol molecules with a tailored PUFA profile in industrial microalgae[J]. Molecular Plant, 2019, 12(4): 474-488
- [5] Dyal SD, Narine SS. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids[J]. Food Research International, 2005, 38(4): 445-467
- [6] Fan KW, Chen F, Jones EB, Vrijmoed LL. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of *thraustochytrids*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2001, 27(4): 199-202
- [7] Xie DM, Jackson EN, Zhu Q. Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(4): 1599-1610
- [8] He SS, Wang YL, Gao BY, Wan LL, Li AF, Zhang CW. Biosynthetic pathway of triacylglycerol in microalgae and its latest research progress[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2014, 26(9): 979-990 (in Chinese)  
何思思, 王元丽, 高保燕, 万凌琳, 李爱芬, 张成武. 微藻三酰甘油合成途径及其最新研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(9): 979-990
- [9] Kennedy EP. Biosynthesis of complex lipids[J]. Federation Proceedings, 1961, 20: 934-940
- [10] Xu Y, Chen GQ, Greer MS, Caldo KMP, Ramakrishnan G, Shah S, Wu LM, Lemieux MJ, Ozga J, Weselake RJ. Multiple mechanisms contribute to increased neutral lipid accumulation in yeast producing recombinant variants of plant diacylglycerol acyltransferase 1[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(43): 17819-17831
- [11] Bhunia RK, Sinha K, Chawla K, Randhawa V, Sharma TR. Functional characterization of two type-I diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) genes from rice (*Oryza sativa*) embryo restoring the triacylglycerol accumulation in yeast[J]. Plant Molecular Biology, 2021, 105(3): 247-262
- [12] Gao HL, Gao Y, Zhang F, Liu BL, Ji CL, Xue JN, Yuan LX, Li RZ. Functional characterization of a novel acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 3-3 (CsDGAT3-3) gene from *Camelina sativa*[J]. Plant Science, 2021, 303: 110752
- [13] Stone SJ, Myers HM, Watkins SM, Brown BE, Feingold KR, Elias PM, Farese RV Jr. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(12): 11767-11776
- [14] Zhang LN, Zhang HY, Song YD. Identification and characterization of diacylglycerol acyltransferase from oleaginous fungus *Mucor circinelloides*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(3): 674-681
- [15] Wang Z. Identification and characterization of diacylglycerol acyltransferase in oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2016 (in Chinese)  
王珍. 产油酵母圆红冬孢酵母二酰甘油酰基转移酶的鉴定和性质研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2016
- [16] Wang HC. Study on the mechanism of lipid synthesis and accumulation in oleaginous fungus *Mortierella alpina*[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2013 (in Chinese)  
王鸿超. 产油真菌高山被孢霉的脂质合成机理研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2013
- [17] Wang L, Chen W, Feng Y, Ren Y, Gu ZN, Chen HQ, Wang HC, Thomas MJ, Zhang BX, Berquin IM, et al. Genome characterization of the oleaginous fungus *Mortierella*

- alpina*[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28319
- [18] Luo XN, Zhu YM, Liu TT, Wang XP, Zhou PP, Bao ZD, Yu LJ. Identification and characterization of a novel diacylglycerol acyltransferase gene from *Mortierella alpina*[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(6): 883-888
- [19] Jeennor S, Veerana M, Anantayanon J, Panchanawaporn S, Chutrakul C, Laoteng K. Diacylglycerol acyltransferase 2 of *Mortierella alpina* with specificity on long-chain polyunsaturated fatty acids: a potential tool for reconstituting lipids with nutritional value[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 263: 45-51
- [20] Xin Y, Lu YD, Lee YY, Wei L, Jia J, Wang QT, Wang DM, Bai FL, Hu HH, Hu Q, et al. Producing designer oils in industrial microalgae by rational modulation of co-evolving type-2 diacylglycerol acyltransferases[J]. Molecular Plant, 2017, 10(12): 1523-1539
- [21] Hao GF. The study of the transcriptional regulation and the source of reducing power during fatty acid synthesis in *Mortierella alpina*[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2014 (in Chinese)  
郝光飞. 高山被孢霉脂肪酸合成过程转录水平调控和还原力来源研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2014
- [22] Hao GF, Chen HQ, Wang L, Gu ZN, Song YD, Zhang H, Chen W, Chen YQ. Role of malic enzyme during fatty acid synthesis in the oleaginous fungus *Mortierella alpina*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(9): 2672-2678
- [23] Mei TT, Chen HQ, Hao GF, Gu ZN, Chen W, Chen YQ. Cloning, expression and characterization of a new  $\omega$ -3 fatty acid desaturase[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(8): 31-37 (in Chinese)  
梅甜甜, 陈海琴, 郝光飞, 顾震南, 陈卫, 陈永泉. 一种新  $\omega$ -3 脂肪酸脱饱和酶的克隆表达和活性鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(8): 31-37
- [24] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(8): 911-917
- [25] Cao HP. Structure-function analysis of diacylglycerol acyltransferase sequences from 70 organisms[J]. BMC Research Notes, 2011, 4(1): 1-24
- [26] Pan X, Peng FY, Weselake RJ. Genome-wide analysis of phospholipid: diacylglycerol acyltransferase (PDAT) genes in plants reveals the eudicot-wide PDAT gene expansion and altered selective pressures acting on the core eudicot PDAT paralogs[J]. Plant Physiology, 2015, 167(3): 887-904
- [27] Yen CLE, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese RV Jr. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis[J]. Journal of Lipid Research, 2008, 49(11): 2283-2301
- [28] Sijtsma L, Swaaf ME. Biotechnological production and applications of the  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(2): 146-153